

предыдущий документ

библиография

реферат

формула

рисунки

№2078345. Описание

Изобретение относится к области препаративной биохимии и, в частности к способам получения из сыворотки крови белковых препаратов, дифференцированно влияющих (ингибирующих или активирующих) на активность окислительно-энергетического обмена организма. Оно может быть использовано в фармакологии для получения новых лекарственных средств природного происхождения и в медико-биологических исследованиях для снижения или интенсификации окислительного энергетического обмена у животных.

Получение физиологически активных соединений природного происхождения является актуальной проблемой современной биохимии, медицины и фармакологии. В отличие от синтезированных препаратов физиологически активные соединения природного происхождения могут оказывать более мягкое воздействие, вступая в естественный метаболизм или селективно регулируя специфическую функцию клетки и организма.

Известен способ получения отдельных белков из плазмы крови путем ее фракционирования этиловым спиртом в возрастающей от 8% до 40% концентрации. При этом последовательно осаждаются белки свертывающей системы крови, глобулины, альбумины и некоторые ферменты (Фром А.А. и др. Белки плазмы и их фракционирование в производстве препаратов крови, М. Медицина, 1974, с.96-129). Примерами биологического действия белков, получаемых таким образом, могут служить

свойства фибриногена и тромбина, как компонентов свертывающей системы крови, ускорять образование сгустка или свойства иммуноглобулинов повышать иммунный ответ организма. Однако, такой способ получения белков не позволяет выделять соединения белковой природы, растворимые при более высоких (выше 40%) концентрациях этилового спирта. Кроме того, ни у одного из известных сывороточных белковых препаратов не обнаружено свойство ингибировать или активировать окислительно-энергетический обмен организма. Способы получения таких препаратов из сыворотки неизвестны.

Основная задача, на решение которой направлено заявляемое изобретение, заключается в том, чтобы разработать способ получения из сыворотки крови белковых препаратов, дифференцированно влияющих на активность окислительно-энергетического обмена организма.

Другая задача состоит в том, чтобы исключить при получении белковых препаратов применение токсичных органических соединений, таких как хлороформ, метанол, эфир.

Решение поставленной задачи достигается тем, что авторами разработан способ получения сывороточных белковых препаратов, дифференцированно влияющих на активность окислительного энергетического обмена организма, заключающийся в том, что целевые продукты экстрагируют этиловым спиртом из сыворотки крови в конечной концентрации не ниже 80% и затем из оставшегося после экстракции осадка проводят повторную экстракцию при конечной концентрации спирта 45-50% экстракты объединяют, концентрируют, удаляют гидрофобные соединения и разделяют на колонке сефадекса G-15, при этом в качестве ингибирующего препарата отбирают первую фракцию, а в качестве

стимулирующего вторую и третью фракции.

Гидрофобные соединения удаляют из экстракта путем ультрацентрифугирования, что позволяет исключить использование таких токсичных веществ, как хлороформ, метанол, эфир, обычно применяемых при выделении белков для удаления гидрофобных соединений.

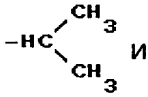
Сущность предлагаемого изобретения состоит в том, что, как было экспериментально обнаружено, белковые вещества, обладающие способностью изменять окислительно-энергетический обмен организма, содержатся в спиртовом экстракте сыворотки, откуда их можно выделить путем гельфильтрации на колонке сефадекса G-15.

На фиг.1 изображены УФ-спектры первых трех белковых фракций, выделенных гельфильтрацией из спиртового экстракта сыворотки крови; на фиг.2 -ЯМР-спектры этих же фракций; на фиг.3 электрофореграммы этих фракций; на фиг.4 график изменения температуры тела мышей, находящихся в состоянии гипотермии, при внутрибрюшинном введении этих белковых фракций.

Как видно из фиг.1, выделенные путем гельфильтрации спиртового экстракта сыворотки крови первые три фракции действительно являются белковыми, так как УФ-спектры этих фракций представляют собой типичные белковые спектры с ярковыраженным поглощением в области 280 нм.

Это же подтверждается фиг.2, на которой представлены ЯМР-спектры этих же фракций, снятые в D₂O по протонному резонансу. Как видно из этих спектров, фракции 1, 2, 3 являются типичными белковыми препаратами, различающимися между собой по средней молекулярной массе белков и наличию прочно

связанных с белками органических соединений, определяемых по специфическим группам.

По данным ЯМР фракция 1 имеет среднюю молекулярную массу 58 kD. Белки этой фракции имеют нативную структуру, в их числе присутствуют гликопротеин. Фракция 2 имеет среднюю молекулярную массу около 30 kD. Фракция 3 представляет собой белковый препарат со средней молекулярной массой 19 kD. Фракции 2 и 3 содержат прочно связанные с белками органические соединения, имеющие сахарную природу, а также соединения с характерными функциональными метильными группами  и ненасыщенными углеродными связями, не принадлежащими жирным кислотам, -CH=CH-.

На фиг.3 представлены электрофореграммы фракций, подтверждающие результаты ЯМР. Молекулярный вес белков убывает от фракции 1 к фракции 3; во всех белковых фракциях определяются гликопротеины. На фиг.3 электрофореграммы "а" окрашены кумасси на белки, электрофореграммы "б" окрашены по Шиффу на гликопротеины, диапазон молекулярных весов белков-метчиков от 97 kD до 14 kD.

Действие полученных белковых препаратов на окислительно-энергетический метаболизм измеряли экспресс-методом по их влиянию на подъем температуры тела мышей, сниженной от нормальной на 17° 20°C в результате комбинированного воздействия гипотермии и гипоксии. Показано ранее, что такое глубокое снижение температуры тела у теплокровных связано со значительным ингибированием окисления субстратов и дыхания в митохондриях. Разогрев животного обусловлен активацией дыхания митохондрий, увеличением потребления кислорода, повышением

окислительно-энергетического обмена (Кондрашова М.Н. и др. В кн. Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки, Л. Наука, 1986, с.55-60; Игнатъев Д. А. В кн. Механизмы зимней спячки, Махачкала, 1990, с.50; Николс Д. Биоэнергетика, М. Мир, 1985, с. 90-93). Таким образом, интенсивность подъема температуры тела точно отражает активацию окислительных процессов в тканях.

На фиг.4 представлены графики изменения температуры тела мышей, находящихся в состоянии гипотермии, при внутримышечном введении белковых препаратов, полученных предлагаемым способом, где график 1 изменение температуры тела при инъекции фракции 1, график 2 изменение температуры тела при инъекции фракции 2, график 3 -изменение температуры тела при инъекции фракции 3, график 4 изменение температуры тела при инъекции физиологического раствора.

Как видно из этих графиков, первая после гельфильтрации фракция (фракция 1) ингибирует, а фракции 2 и 3 активируют скорость нарастания температуры тела. У контрольной группы животных нормальная температура устанавливается в течение 5 ч, при введении животным фракции 1 через такое же время температура поднимается только до 28°C, а при введении фракций 2 и 3 температура тела интенсивно нарастает уже в первые 2 ч. Максимально выраженные эффекты активации и ингибирования достигаются к 2,5 ч после инъекции препаратов. В этом диапазоне температур различия между температурами тела животных, получивших препараты, по сравнению с контрольными достоверны (для фракции 1 $p < 0,50$; для фракции 2 $p < 0,05$); различия достоверны также между эффектами фракций 1 и 2 ($p < 0,001$) и фракций 1 и 3 ($p < 0,05$).

Длительное многотонное возрастание температуры тела

экспериментальных животных до физиологической нормы отличает действие полученных фракций, активирующих обмен, от действия пирогенов. Кроме того, присутствие пирогенов в белковых фракциях исключается благодаря гельфильтрации и диализу, т.е. процедурам, удаляющим низкомолекулярные соединения, к которым относятся пирогены.

Таким образом, технический результат, который может быть получен при осуществлении предлагаемого изобретения, заключается в том, что разработан способ, позволяющий в препаративных количествах получить белковые вещества, активирующие или ингибирующие окислительно-энергетический обмен организма, и не требующий применения токсичных растворителей.

Предлагаемый способ иллюстрируется следующим примером конкретного выполнения.

Пример: К 100 мл сыворотки крови быка приливают 500 мл охлажденного до 4°C 96% этилового спирта. Смесь перемешивают при этой же температуре в течение 30 мин и центрифугируют при 5,5 тыс. об/мин 30 мин. Супернатант концентрируют на вакуумном испарителе, а к полученному осадку добавляют 500 мл охлажденного 50% этанола, 30 мин перемешивают и центрифугируют при 5,5 тыс. об/мин в течение 30 мин. Осадок отбрасывают, полученный супернатант объединяют с предыдущим супернатантом и концентрируют на вакуумном испарителе до объема 50 мл. Этот объединенный концентрированный супернатант представляет собой экстракт целевого продукта из исходного сырья.

Полученный экстракт центрифугируют на ультрацентрифуге

при 100 тыс. об/мин с охлаждением в течение 1,5 ч до получения прозрачного супернатанта, пригодного для последующей хроматографии, а осадок, содержащий гидрофобные соединения, отбрасывают. Весь супернатант наносят однократно на колонку с сефадексом G-15 объемом 1,3 л. Элжирование белковых фракций проводят дистиллированной водой с помощью перистальтического насоса со скоростью 100 мл/ч при свободном объеме колонки 460 мл.

В связи с тем, что фракция 3 содержит соли, ее подвергают диализу против дистиллированной воды в течение 24 ч с 5-кратной сменой диализной воды. Полученные фракции концентрируют на вакуумном испарителе и затем лиофилизируют. Полученные фракции содержат блок в количествах, указанных в таблице, и не содержат низкомолекулярные соединения, поскольку процедура выделения включает гель-хроматографию (молекулярное сито для белков) и диализ.

В лиофилизированном виде полученные белковые препараты представляют собой гомогенные порошкообразные вещества, очень хорошо растворимые в воде. Водные растворы препаратов бесцветны, имеют щелочные pH. Свежеприготовленные водные растворы имеют следующие pH: препарат фракции 1 6,9; препарат фракции 2 7,15; препарат фракции 3 -7,9.

Влияние полученных белковых препаратов на активность окислительно-энергетического обмена определяли по их воздействию при внутрибрюшинном введении на скорость нарастания температуры тела у мышей, предварительно находившихся в условиях гипоксии при температуре среды 15°C и имевших температуру тела 18° 20°C. В каждой экспериментальной группе было по 10 животных. Полученные лиофилизированные

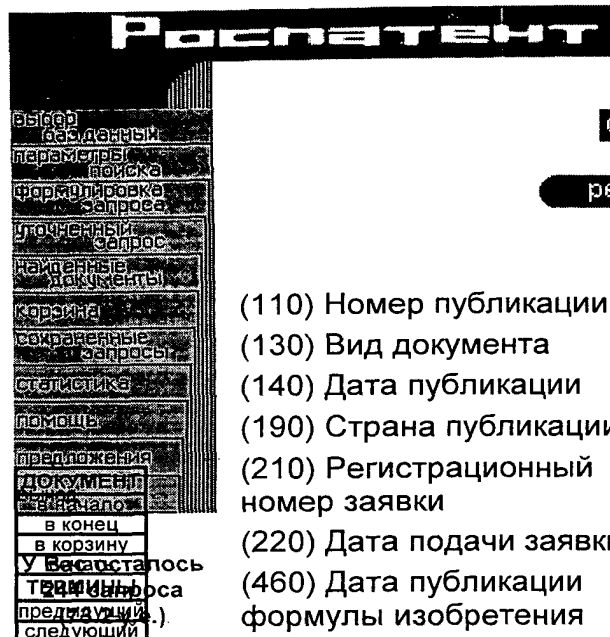
группы были по 10 животных. Тему темные дифференцированные препараты растворяли в 2 мл дистиллированной воды, отдельно каждый препарат, и вводили по 0,2 мл на животное. Первой группе животных вводили по 0,2 мл препарата фракции 1. Второй группе животных вводили по 0,2 мл препарата фракции 2, третьей группе соответственно по 0,2 мл препарата фракции 3. Четвертой группе контрольной, вводили внутривентрально по 0,2 мл физиологического раствора.

Животных после инъекции содержали при температуре среды 15°C и каждые 15 мин проводили измерения температуры тела *per rectum* с помощью электродного датчика.

Результаты измерений, статистически обработанные, представлены в виде графиков на фиг.4. Как видно из этих графиков у контрольных животных нормальная температура тела устанавливается через 5 ч. Белковый препарат фракции 1 ингибирует этот процесс, а белковые препараты фракций 2 и 3 стимулируют его, причем препарат фракции 2 более эффективно, чем препарат фракции 3.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить белковые препараты из сыворотки крови, дифференцированно влияющие на окислительно-энергетический обмен, ингибируя или активируя выход животного из состояния индуцированной гипотермии. Препараты могут быть использованы в целях снижения или интенсификации окислительного энергетического обмена.

[библиография](#)[реферат](#)[формула](#)[рисунки](#)[предыдущий документ](#)



[следующий документ](#)

[реферат](#)

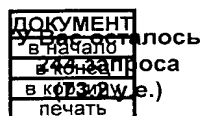
[рисунок](#)

(110) Номер публикации **2078345**
 (130) Вид документа **C1**
 (140) Дата публикации **1997.04.27** [поиск](#)
 (190) Страна публикации **RU**
 (210) Регистрационный номер заявки **5035810/14**
 (220) Дата подачи заявки **1992.04.03**
 (460) Дата публикации формулы изобретения **1997.04.27** [поиск](#)
 (516) Номер редакции МПК **6**
 (511) Основной индекс МПК **G01N33/68** [поиск](#) [МПК](#)
 Название **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА, ВЛИЯЮЩЕГО НА АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА**
 (711) Имя заявителя **Аникеева Светлана Петровна** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Аникеева С.П.** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Федотчева Н.И.** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Миронова Г.Д.** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Кондрашова М.Н.** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Сирота Т.В.** [поиск](#)
 (721) Имя изобретателя **Скарга Ю.Ю.** [поиск](#)
 (731) Имя патентообладателя **Аникеева Светлана Петровна** [поиск](#)

[реферат](#)

[рисунок](#)

[следующий документ](#)

Роспатент[предыдущий документ](#)[библиография](#)[реферат](#)[описание](#)[рисунки](#)**№2078345. Формула**

1. Способ получения сывороточного белкового препарата, влияющего на активность окислительно-энергетического обмена организма, заключающийся в том, что целевые продукты экстрагируют этиловым спиртом из сыворотки крови в конечной концентрации спирта не ниже 80% и осадка в конечной концентрации спирта 45 50% экстракты объединяют, концентрируют, удаляют гидрофобные соединения и разделяют гель-хроматографией на колонке сефадекса G 15, при этом в качестве элюента используют дистиллированную воду, а в качестве ингибирующего препарата отбирают первую фракцию, содержащую белки со средней молекулярной массой 58 кД, гидрофильную, объем выхода которой составляет 1/3 объема сефадекса, а в качестве стимулирующего препарата отбирают вторую фракцию, содержащую белки со средней молекулярной массой 30 кД, гидрофильную, объем выхода которой составляет 1/2 объема сефадекса, а также третью фракцию, содержащую белки со средней молекулярной массой 19 кД, гидрофильную, объем выхода которой составляет 2/3 объема сефадекса.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гидрофобные соединения удаляют из экстракта путем ультрацентрифугирования.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что процесс сбора фракций, начиная с первой фракции, ведут непрерывно.

[библиография](#)[реферат](#)[описание](#)[рисунки](#)[предыдущий документ](#)

библиография

ОПИСАНИЕ

формула.

РИСУНКИ

№2078345. Реферат

Задача получения белковых препаратов из сыворотки крови, стимулирующих или ингибирующих активность окислительно-энергетического обмена организма, ставится впервые. Сущность изобретения состоит в том, что целевой продукт экстрагируют этиловым спиртом из сырья в конечной концентрации спирта 80% и осадка, оставшегося после отделения первого экстракта, в концентрации спирта 45 - 50%. Экстракты объединяют, концентрируют, удаляют путем центрифугирования гидрофобные соединения и разделяют гель-хроматографией на колонке сефадекса G-15. В качестве ингибирующего препарата отбирают первую фракцию, а в качестве стимулирующего - вторую и третью фракции. Способ позволяет исключить необходимость использования токсичных растворителей, таких как метанол, хлороформ, эфир. 2 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.

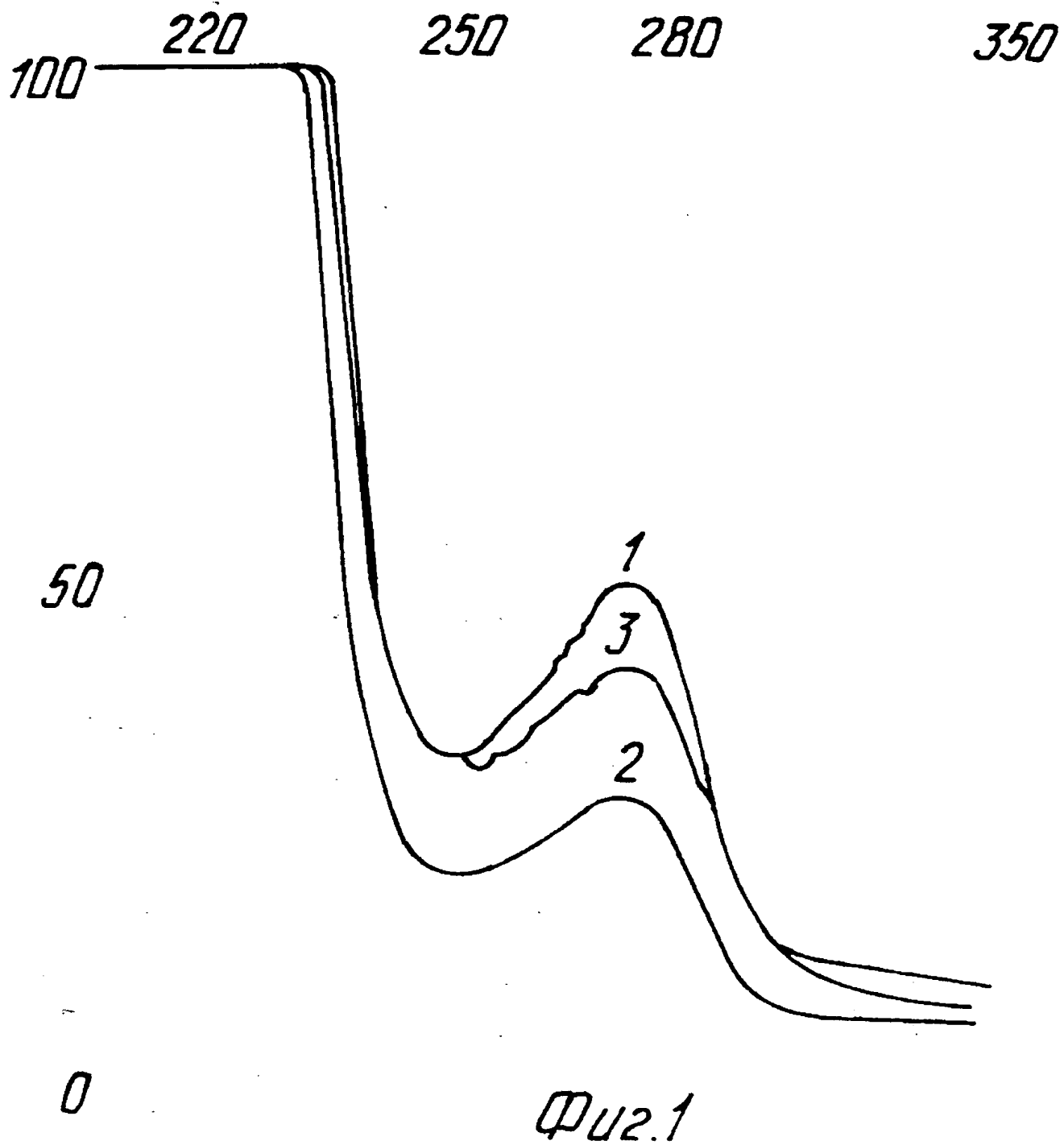
библіографія

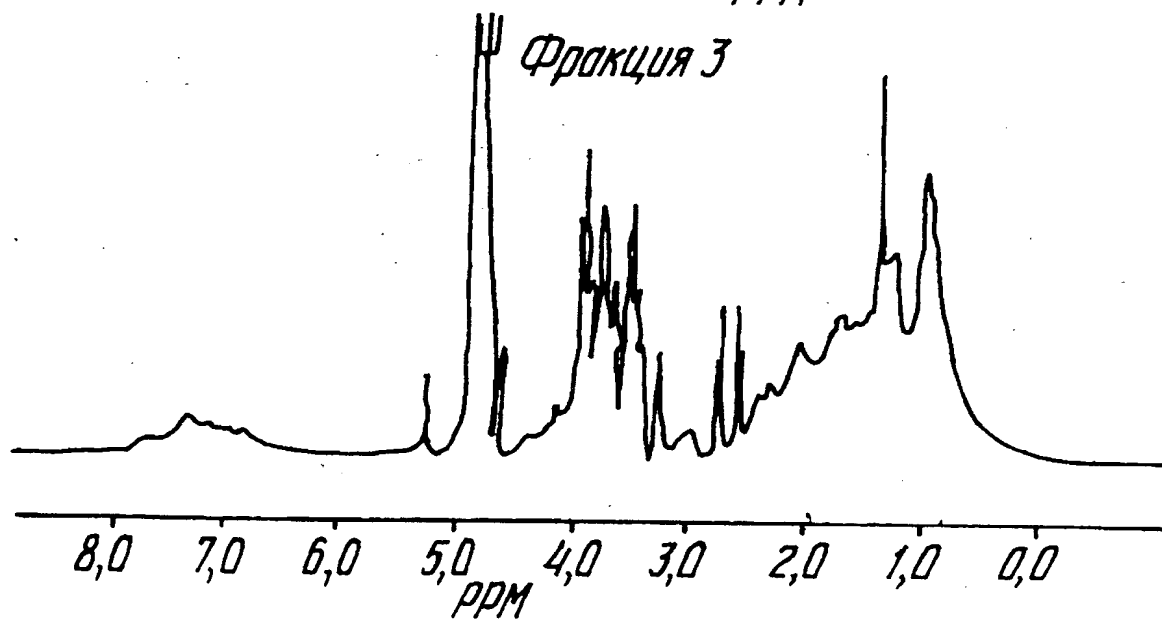
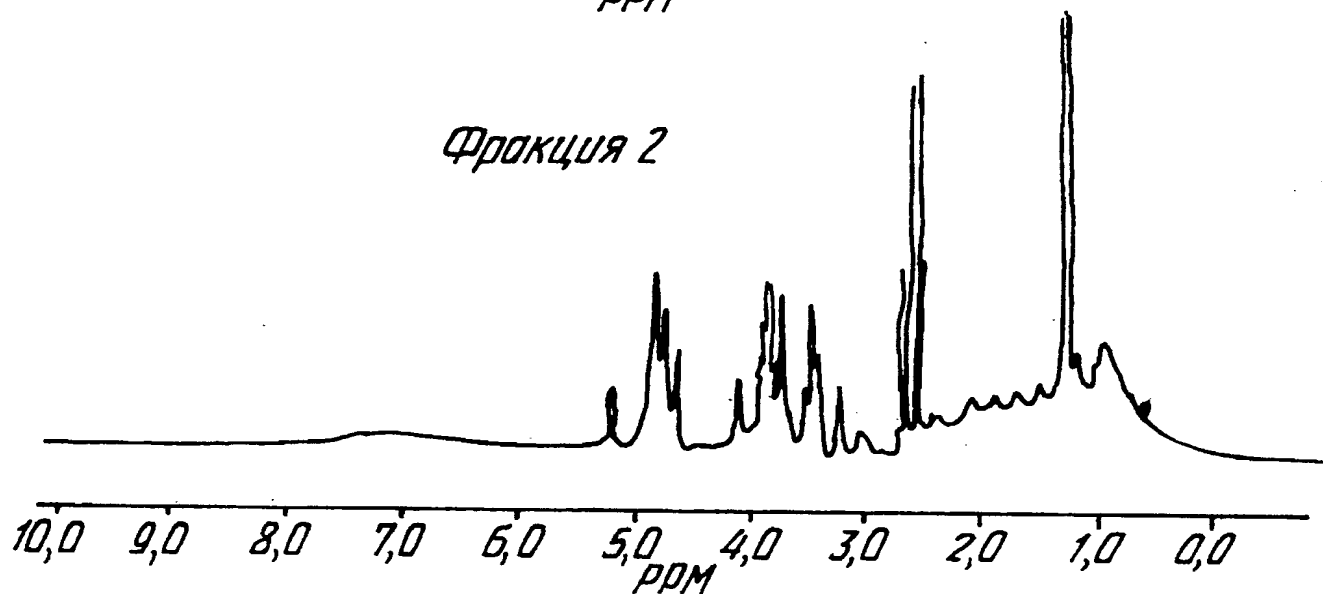
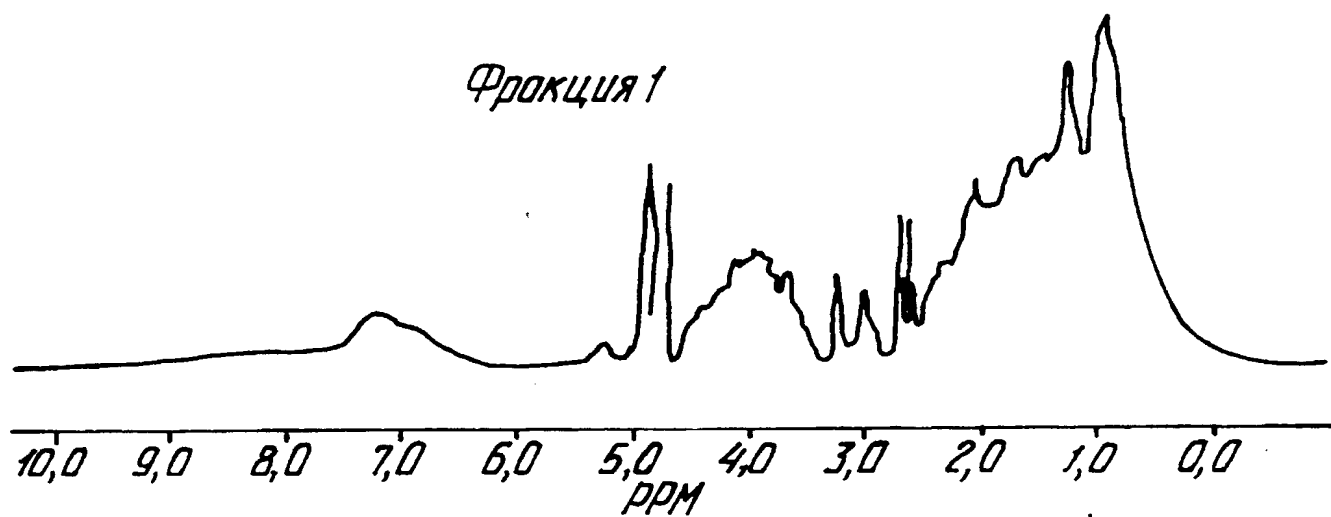
ОПИСАНИЕ

формула

рисунки

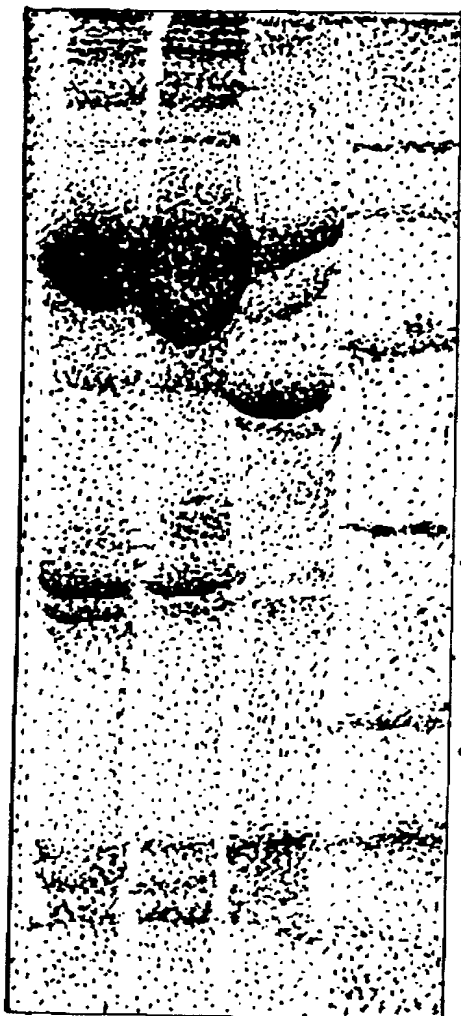
предыдущий документ





Фиг. 2

1 2 3



97

66

45

31

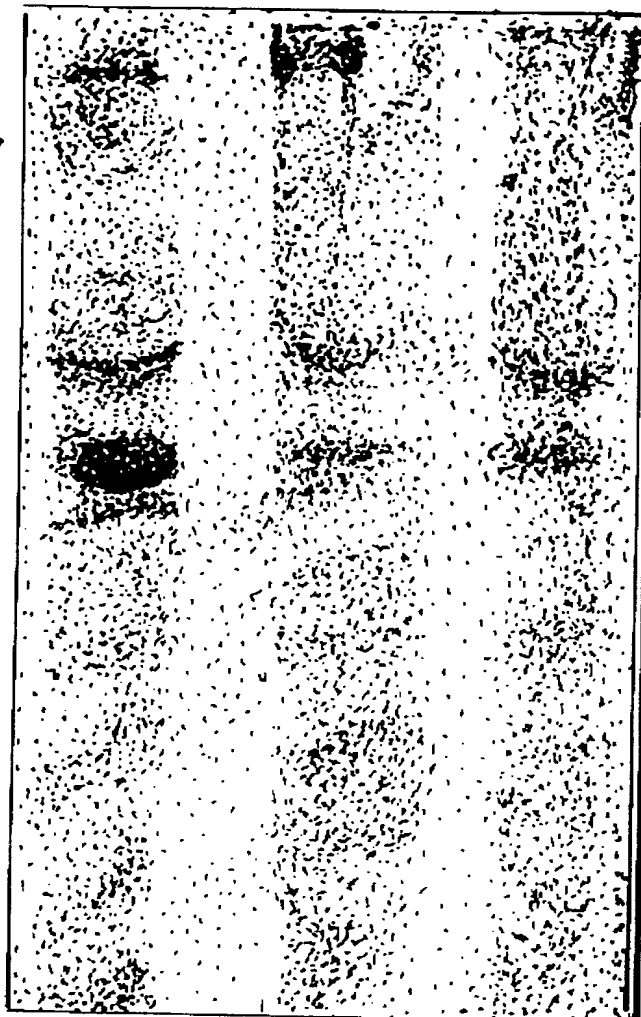
21

14

1

2

3

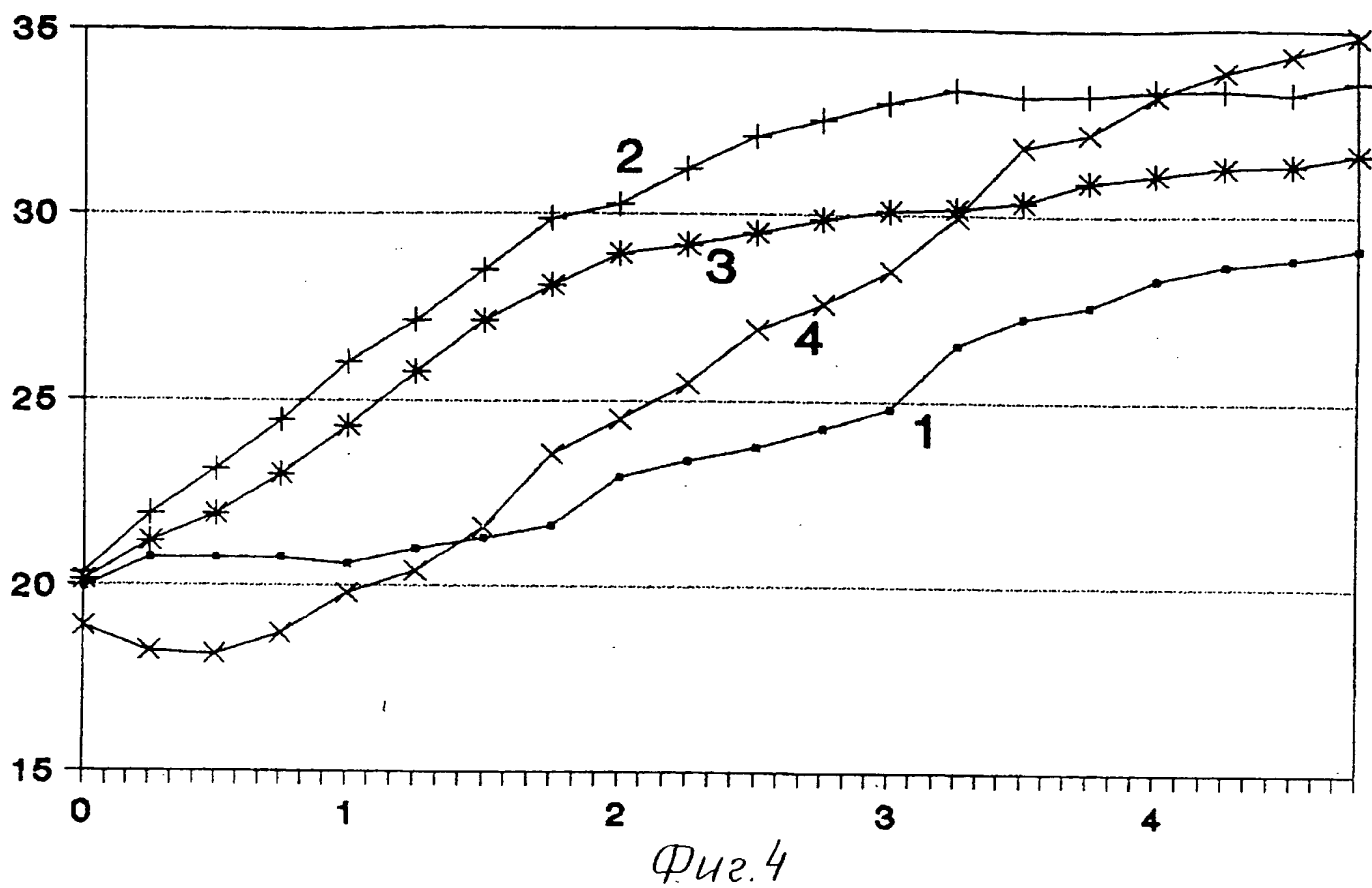


a

b

φu2.3

$\dot{t}^{\circ}\text{C}$



Параметры элюирования белковых фракций

| № фракции | мл элюирования | объем фракции в мл | содержание белка в мг на фракцию |
|-----------|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | 460 | 190 | 242,5 |
| 2 | 650 | 250 | 100,2 |
| 3 | 900 | 280 | 18,2 |